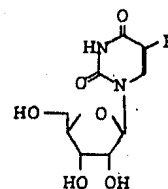


(54) PRODUCTION OF 2',5'-DIHALO-2',5'-DIDENOXYURIDINE OR ITS DERIVATIVE

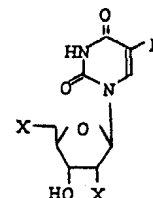
- (11) 59-148797 (A) (43) 25.8.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-22352 (22) 14.2.1983
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO K.K. (72) KOUSAKU HIROTA(1)
 (51) Int. Cl.³. C07H19/06//A61K31/70

PURPOSE: The reaction of uridine with phosphorus oxychloride or oxybromide is conducted in dimethylformamide to enable 1-step preparation of the titled compound having antitumor activity without protection of uridine.

CONSTITUTION: The objective compound of formula II (X is Cl or Br) is obtained by reaction of uridine or its derivative of formula I (R is H, halogen, 1~4C alkyl) with phosphorus oxychloride or oxybromide in dimethylformamide, preferably at 50~100°C for 1~5hr. The compounds of formula II other than 2',5'-dichloro-2',5'-dideoxyuridine and 2',5'-dichloro-2',5'-dideoxy-5-fluorouridine are novel.



I



II

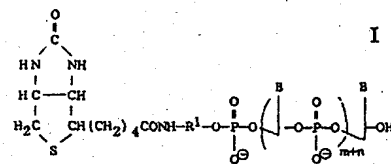
(54) BIOTIN NUCLEOTIDE DERIVATIVE AND ITS PREPARATION

- (11) 59-148798 (A) (43) 25.8.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-22516 (22) 14.2.1983
 (71) WAKUNAGA SEIYAKU K.K. (72) KENICHI MIYOSHI(2)
 (51) Int. Cl.³. C07H21/02, C07H21/04

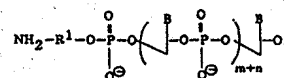
NEW MATERIAL: A compound of formula I (m, n are 0, optional natural number; R¹ is divalent straight-chain or branched hydrocarbon residue; B is base constituting nucleotides).

USE: Biochemical reagent for determination of antigen density per cell, radioimmunoassay and enzyme immunoassay.

PREPARATION: For example, biotin is linked by allowing an activated ester of biotin, e.g., succinimide-ester to act on the amino group of an oligonucleotide derivative of formula II (a primary amino group is introduced via group R¹ to 5'-terminal phosphoric acid group of oligodeoxynucleotide).



I



II

(54) ENLARGEMENT OF SYNTHETIC RUBBER PARTICLES

- (11) 59-149902 (A) (43) 28.8.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-24400 (22) 16.2.1983
 (71) MITSUBISHI RAYON K.K. (72) KAZUO KISHIDA(3)
 (51) Int. Cl.³. C08C1/065

PURPOSE: To enlarge synthetic rubber latex particles effectively, by adding an acid group-containing copolymer latex obtained by emulsion-polymerizing a mixture of an acid group-containing monomer, an alkyl acrylate, etc., to a synthetic rubber latex.

CONSTITUTION: An acid group-containing copolymer latex is prepared by emulsion-polymerizing 0.5~30wt% acid group-containing monomer selected from the group consisting of (meth)acrylic acid, itaconic acid and crotonic acid with 99.45~35wt% alkyl acrylate containing a 1~12 C alkyl group, 0.05~10wt% copolymerizable polyfunctional monomer (e.g., ethylene diglycidyl diacrylate) and 0~48wt% monovinyl monomer copolymerizable therewith (e.g., styrene). 0.01~10pts.wt. (in terms of solid content) above-produced acid group-containing copolymer latex is added to 100pts.wt. (in terms of solid content) synthetic rubber latex to enlarge the synthetic rubber particles.

⑬ 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—148798

⑤ Int. Cl.³
C 07 H 21/02
21/04

識別記号

庁内整理番号
7252—4 C
7252—4 C

⑬ 公開 昭和59年(1984) 8 月25日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑤4 ビオチンヌクレオチド誘導体およびその製造法

② 特 願 昭58—22516

② 出 願 昭58(1983) 2 月14日

⑦ 発 明 者 三好健一

広島県高田郡甲田町下甲立1624
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑦ 発 明 者 鈴木正則

広島県高田郡甲田町下甲立1624
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑦ 発 明 者 不破亨

広島県高田郡甲田町下甲立1624
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑦ 出 願 人 湧永製薬株式会社

大阪市福島区福島三丁目 1 番39
号

⑦ 代 理 人 弁理士 猪股清

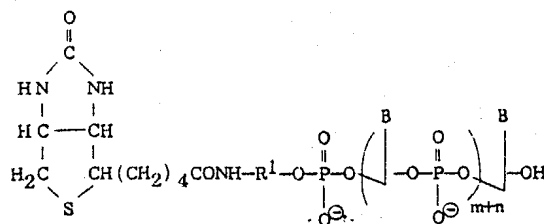
外 3 名

明 細 書

1. 発明の名称 ビオチンヌクレオチド誘導体
およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式〔VII〕で示されるビオチン-オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、
ビオチンヌクレオチド誘導体。



〔VII〕

〔ただし、m および n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、R¹ は 2 価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、B はヌクレオチドを構成する塩基である (B が複数個存在するときは、

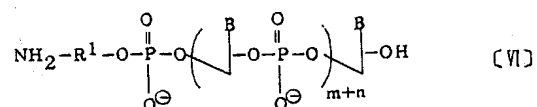
それらは同一でも異なつてもよい)。〕

2. 塩基 B がアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、
特許請求の範囲第 1 項記載のビオチンヌクレオチド誘導体。

3. R¹ が炭素数 2 ~ 20 の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のビオチンヌクレオチド誘導体。

4. m が 0 または 6 までの自然数、n が 0 または 40 までの自然数である、特許請求の範囲第 1 ~ 3 項のいずれか一項に記載のビオチンヌクレオチド誘導体。

5. 下式〔VI〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて下式〔VII〕で示されるビオチン-オリゴデオキシリボヌクレオチドを得ることを特徴とする、ビオチンヌクレオチド誘導体の製造法。



〔VI〕

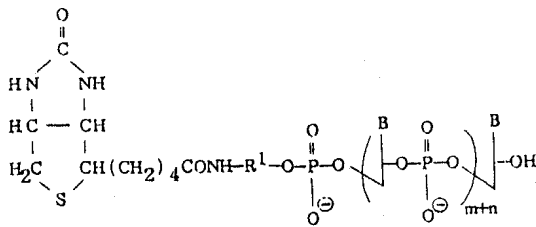
発明の背景

技術分野

本発明は、一般に、ビオチンスクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、スクレオチドの塩基以外の部分にビオチンを結合させてなるビオチンスクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このようなビオチンスクレオチド誘導体の製造法にも関する。

先行技術

ビオチンはビタミンB複合体の一つであつてビタミンHとも呼ばれ、多くの動植物の生育に必要な物質である。一方、ビオチンは卵白中のアビジンと強力に相互作用を行なうことが知られておりその点に着目してビオチンをその誘導体の形で利用するものとしてたとえばビオチン-アビジン試薬がある。これは、細胞あたりの抗原密度の測定、ラジオイムノアッセイおよびエンザイムイムノアッセイ等の生化学試薬として応用されている。また、ビオチンと核酸とを結合させた、感染および遺伝疾患の診断用DNAプローブが開発され(Proc.



〔VII〕

6. アミノ基とビオチンとの結合をアミノ基とビオチン活性エステルとの反応によつて行なう、特許請求の範囲第5項記載の方法。
7. ビオチン活性エステルがビオチンスクシンイミドまたはビオチン-パラニトロフェニルエステルである、特許請求の範囲第6項記載の方法。
8. アミノ基とビオチンとの結合を縮合剤の作用下に行なう、特許請求の範囲第5項記載の製造法。
9. 縮合剤がジシクロヘキシルカルボジイミドである、特許請求の範囲第8項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

Natl. Acad. Sci. USA 78、6633-6637

(1981))、市販化されるに至っている。このDNAプローブにおける、ビオチンスクレオチド誘導体の製造は、シチジントリホスフェート(dCTP)のビオチン誘導体をシチジントリホスフェートの代わりに使用して酵素的にDNAあるいはRNAを鋳型にして行なつたものである。

しかし、本発明者らの知るところによれば、このようにして製造されるビオチンスクレオチド誘導体には下記のような問題点がある。

- イ、スクレオチドの塩基部分にビオチンを含有するため使用オリゴヌクレオチド固有の融解温度(Tm値)に変化を生じる。
- ロ、シトシン誘導体の合成が困難である(上記文献より)。
- ハ、任意でかつ定められた塩基配列をもつDNAの合成が困難である。

これらの理由によつて、現段階でのビオチン-スクレオチド誘導体は、その応用範囲が狭く、有用性が限定されているのが現状である。

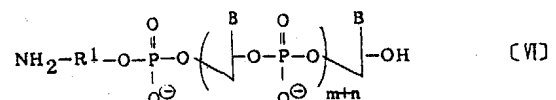
発明の概要

要旨

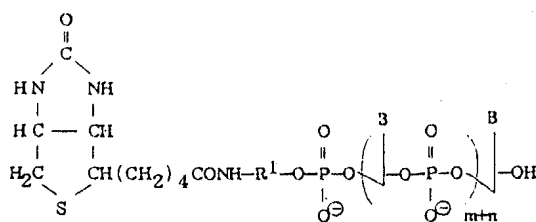
本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボヌクレオチドのスクレオチド塩基以外の特定部位にビオチンを結合させてなるビオチンスクレオチド誘導体によつてこの目的を達成しようとするものである。

従つて、本発明によるビオチンスクレオチド誘導体は下式〔VII〕で示されるビオチン-オリゴデオキシリボヌクレオチドであること、を特徴とするものである。

また、本発明によるビオチンスクレオチド誘導体の製造法は、下式〔VI〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて下式〔VII〕で示されるビオチン-オリゴデオキシリボヌクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



〔VI〕



〔VII〕

〔ただし、 m および n はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^1 は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 B はヌクレオチドを構成する塩基である（ B が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい）。〕

効果

本発明者らの合成したビオチン-オリゴデオキシリボヌクレオチドは、前記核酸用非放射性アフィニティプローブの短所を回避することができて、下記のような長所をもつものである。

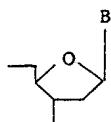
イ、ヌクレオチドの塩基部分にビオチンを含有しないので融解温度（ T_m 値）に変化を生じることがなくて安定である。

ビオチンヌクレオチド誘導体〔VII〕

本発明によるビオチンヌクレオチド誘導体は、前記の式〔VII〕で示されるものである。

式中、記号 B は、2'-デオキシリボヌクレオ

シドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオチド残基を示すのに慣用されているものであつて、具体的には下記の構造のものである。



置換基 B はヌクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物〔VII〕中に B が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい。

m および n は、それぞれ0または自然数を示す。本発明ビオチンオリゴヌクレオチド誘導体の重合度が $m+n$ で表示されているのは、本発明の好ましい製造法で重合度がそれぞれ m および n のフラ

グ、いかなる塩基配列をもつビオチン-オリゴヌクレオチドも合成可能である。

ハ、プローブとして短鎖オリゴマーで十分である。

ニ、合成が非常に簡単であつて、大量合成が可能である。

ホ、プライマー（鋳型合成の際のDNA断片）としても利用できる。

このような長所があるところから、本発明によればビオチンヌクレオチド誘導体の利用方法の拡大も考えられる。すなわち、例えば、ビオチン-オリゴヌクレオチドは非放射性核酸用アフィニティプローブとして、あるいはプライマーとして利用可能であることは前記したところであつて、その検出方法も抗体による沈降、酵素の活性測定、アビジン-セファロースによるアフィニティカラム蛍光性染色体による可視化等々、多様であり、また放射性プローブ（ ^{32}P ）に比べて被曝の危険、コスト、廃棄物の処理および保存性等の点で有利である。

発明の具体的説明

クシオンを縮合させていることによるものである（詳細後記）。その場合の m は実用的には0～6、特に1～4、 n は実用的には0～40、特に0～20、である。

基 R^1 は、化合物〔VII〕の核酸部分とビオチン部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基である。これは、特に炭素数2～20程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましい R^1 は、炭素数2～6のアルキレン基である。

化合物〔VII〕の合成

一般的説明

化合物〔VII〕、すなわち本発明によるビオチンヌクレオチド誘導体、は合目的な任意の方法によつて合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式〔VII〕のオリゴヌクレオチド誘導体、すなわちオリゴデオキシヌクレオチドの5'-末端リン酸基に基 R^1 を介して一級アミノ基が導入されたもの、のアミノ基にビオチンを結合させることからなるものである。

一方、式〔VI〕の化合物は、オリゴヌクレオチド

の合成および生成オリゴヌクレオチドの5'-水酸基延長上での一級アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

第1図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ（その意義ないし詳細は、後記した通りである）。

R⁰ リン酸基を保護する置換基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

R¹ 二価の炭化水素残基である。

R² 5'-末端水酸基の保護基であつて、通常ジメトキシトリチル基が用いられる。

R³ 他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であつて、通常シアノエチル基が用いられる。

R⁴ アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロアセチル基が用いられる。

q nより小さい任意の自然数。

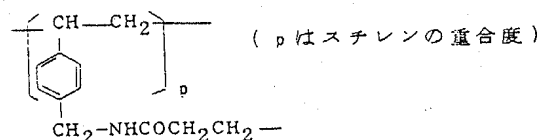
m 0または任意の自然数。

n 0および任意の自然数。

B 塩基を示す。

B' 保護された塩基を示すが、通常はN⁶-ベンゾイルアデニン、N-イソブチルグアニン、N⁶-ベンゾイルシトシンおよびチミン（すなわち、保護不要）より選択される。

⑤ スペースを介した担体であつて、通常は下記のものである。



BIOT* ビオチン活性エステル

化合物[VI]の合成

一般にオリゴヌクレオチド合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの固相法および液相法がある。本発明者らは既に固相法によるオリゴヌクレオチドの^{製造技術}確立しており、化合物[VI]の合成には本発明者らの下記の方法が

好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 3635(1979)

Nucleic Acids Reserch 8, 5473(1980)

Nucleic Acids Reserch 8, 5491(1980)

Nucleic Acids Reserch 8, 5507(1980)

Nucleic Acids Reserch Symposium Series

7, 281(1980)

また、上記で合成したオリゴヌクレオチドの5'-水酸基にリン酸基を介して一級アミノ基を導入する方法すなわち、化合物[VI]の合成法としては、たとえば本発明者らの特願昭57-138136号明細書記載の方法がある。

化合物[VI]の合成法をその一実施態様について示せば、下記の通りである。すなわち、第1図に示したように、化合物[I]の保護基R³を除去したものと化合物[II]の保護基R²を除去したものとを縮合させ、これらの操作をくり返すことによつて、化合物[III]を合成する。オリゴヌクレオチド化合物[III]の合成法は、上記の通り公知である。

一方、本発明者らの方法（特願昭57-138136

号明細書参照）に従つて、式[IV]の化合物を合成する。すなわち、化合物[I]のR²を除去して5'-水酸基化合物とし、これにリン酸化剤（たとえば、ホスホトリアゾリド、ホスホクロリドまたはホスホベンゾトリアゾリド等）を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物R²-NH-R¹-OH〔この化合物はオメガ-アミノアルコール（NH₂-R¹-OH）のアミノ基をR²で保護することにより得ることができる〕を縮合させることにより、化合物[IV]を得ることができる（詳細は該明細書参照）。

この化合物[IV]の保護基R³を除去し、化合物[III]の保護基R²を除去したものとを縮合させて、化合物[V]を合成する。縮合は、化合物[III]の合成の際の縮合と本質的には変わらない方法で行なうことができる。

このようにして合成された化合物[V]の保護基をすべて除去すれば、化合物[VI]が得られる。保護基COR⁴基、リン酸トリエステル中のオルトクロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、

0.5Mのテトラメチルグアニジン-ピリジン-2-カルボアルドキシムのジオキサン-水(9:1, (V/V))溶液で処理後、アルカリ処理(濃アンモニア水)を行なうことにより除去される。 R^4 がトリフルオロアセチル基の場合は、アンモニア処理により充分脱離されるが、オルトニトロフェニルスルフェニル基である場合はメルカプトエタノール処理が必要である。 R^4 として他の保護基を用いた場合は、オリゴヌクレオチド部分が安定な条件下で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴリボヌクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であつて、保護基の種類およびその導入ないし除去ならびに縮合その他について上記以外の詳細は核酸の化学合成に関する成書や総説たとえば「ヌクレオシド・ヌクレオチドの合成」(丸善1977年)、「核酸有機化学」(化学同人1979年)、「核酸」(朝倉書店1979年)、Tetrahedron, 34, 3143(1978)、有合化, 34, 723(1978)および化学の領域, 33, 566(1979)等を参照することができる。

たはその活性エステルである。

このような意味でのアミノ基とビオチンとの結合を行なわせる一つの好ましい方法は、アミノ基とビオチン活性エステルとの反応によることとなるものである。ビオチン活性エステルが好ましいのは、一般に、オリゴヌクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないで5'-水酸基末端延長上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。「ビオチン活性エステル」とは他の官能基(通常アミノ基)と反応しやすいエステル結合を持つビオチン誘導体を意味し、具体的にはスクシンイミド-、パラニトロフェニル-、ベンゾトリアゾリド-、2,4,5-トリクロロフェニル-エステル等がある。前二者が好ましい。

アミノ基とビオチンとの結合を行なわせる他の好ましい方法の一つは、両者の結合を縮合剤の存在下に行なうことからなるものである。縮合剤として適当なものの例を挙げれば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルイミダゾール、ウツ

化合物(VII)の合成

ビオチン-オリゴデオキシリボヌクレオチド(化合物(VII))は、上記化合物(VI)の5'-末端延長上の一級アミノ基にビオチンを結合させることによつて得ることができる。

両者の結合はビオチンのカルボキシル基と化合物(VI)のアミノ基との間の脱水によるアミド結合の形成を実現することのできる任意の方法によつて行なうことができる。化合物(VI)中にビオチンのカルボキシル基との反応が可能なアミノ基または水酸基が存在するときは、それらを適当に保護した状態でこの反応を行なうことができる。従つて、本発明で「式(VI)で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて式(VII)で示されるビオチン-オリゴヌクレオチドを得る」という表現は、化合物(VI)がこのように保護されている場合をも包含するものである。また、この表現は、ビオチンがその機能的誘導体の形にある場合をも包含するものである。ビオチンの機能的誘導体の具体例は、その酸ハライドま

ドワード試薬"K"等がある。ジシクロヘキシルカルボジイミドが好ましい。

いずれの方法による場合にも、反応方法は合目的な任意のものでありうる。所与の反応系に対する具体的な反応方法は、後記実験例および各種の成書、たとえば、「ペプチド合成」(丸善1975年)および「タンパク質の化学IV」(1977年)を参照して適当に定めればよい。

実験例

1) フローチャート

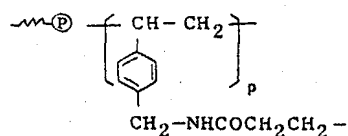
第2図のフローチャートに従つて、本発明化合物(同図の化合物(1))を製造した。

第2図で、記号は次の意味を持つ。

B' ベンゾイル化アデニン

B アデニン

DMTr ジメトキシトリチル



R⁰ オルトクロロフェニル

Et エチル

CE -シアノエチル

m 2

n' 2

n 12

2) 化合物〔VI〕(第2図の⑩)の合成

実験1-1

ジメトキシトリチルアデノシン/樹脂〔①〕
(樹脂は担体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので、樹脂に担持された当該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶことにする) 300mg (0.033mmol) をイソプロパノール-塩化メチレン (15:85, V/V) 溶液 10 ml で3回洗浄後、臭化亜鉛の 1.0M のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8 ml で5分間ずつ4回反応(脱トリチル化)させて樹脂〔②〕を得る。樹脂〔②〕をイソプロパノール-塩化メチレン溶液 10 ml で3回洗浄し、これにジヌクレオチド〔③〕150mg (0.1mmol) のピリジン溶液

を添加後、共沸させて系を無水とし、メシチレンスルホニルニトロトリアゾリド(以下MSNTと記す) 150mg (0.5mmol) と無水ピリジン 2 ml とを添加して90分間反応(縮合)させる。反応後、ピリジン 10 ml で3回洗浄し、触媒炭(約10 mg)のジメチルアミノピリジン(以下DMAP)を含む無水酢酸-ピリジン (1:9, (V/V)) 溶液 10 ml を添加し10分間反応させて未反応 5'-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジンで洗浄して、化合物〔④〕(n=2)を得る。以上のような操作を6回くり返して、化合物〔④〕(n=12)を得る。

一方、5'-ヒドロキシ-ジヌクレオチド〔⑤〕800mg (0.71mmol) とオルトクロロフェニルホスホトリアゾリドとを後者のジオキサン溶液 (1.0mmol, 6 ml) 中で2時間反応させ、続いてトリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール 300 mg (1.4mmol) および1-メチル-イミダゾール 115 mg (1.4mmol) を加えてさらに2時間反応させる。反応終了後、溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解した後、水、0.5 M リン酸二水

素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および5%の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を濃縮後、シリカゲルカラムで精製(溶出液として0~4%のメタノール含有クロロホルムを使用)し、溶出液を濃縮後ペンタン中に滴下し粉末状の化合物〔⑥〕を得る。

上記で合成した化合物〔④〕(n=12) 115mg, (3.45 μmol) を前述と同様の方法で脱トリチル化したもの〔⑦〕に、化合物〔⑧〕60mg (0.04mmol) をトリエチルアミン-ピリジン-水 (1:3:1, V/V) 溶液 3 ml で処理(脱シアノエチル化)した化合物〔⑧〕を加え、無水にしたのち、MSNT 50mg (0.2mmol) およびピリジン 1 ml を加え90分間反応(縮合)させ、反応終了後ピリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴヌクレオチド誘導体〔⑨〕を得る。

オリゴヌクレオチド誘導体〔⑨〕15 mg を0.5 M テトラメチルグアニジン-ピリジン-2-カルボアルドキシメイトのジオキサン-水 (9:1、

(V/V) 溶液 200 μl を加え、遠沈管中、室温で24時間反応させる。反応後、緩アンモニア水 (2.5 ml) を加えて密閉し、50℃で一晩反応させる。反応終了後、ろ過し、濾液を濃縮後、水に溶解させてからエーテルで抽出を行なう。水層を濃縮後、セファデックス G-50 (φ1.5×120 cm, 溶出液は0.05 M の重碳酸トリエチルアンモニウム緩衝液 pH7.5) で脱塩精製しペンタデカアデニル酸誘導体〔⑩〕を得た。

また同様の方法で実験1-2、1-3および1-4のようなオリゴヌクレオチド誘導体を得た。以上で合成した化合物を第1表に示す。

第1表

誘導体 実験例	化合物 ⑩ の 内容	
	m+n	(B) _{m+n} B
1-1	14	A A A A A A A A A A A A A A A A
1-2	14	T T T T T T T T T T T T T T T T
1-3	14	G G A T G C A T C A C C A C C
1-4	16	A A T C T G G T G A G A A G C G C

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

これら4種の化合物の高速液体クロマトグラフィーの結果を第3図に示す。A~Dは、それぞれ実験1-1~1-4の化合物についての図である。

3) ビオチン-ペンタデカアデニル酸 [(4)] の製造

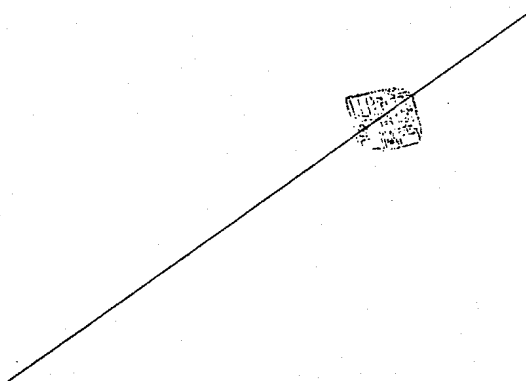
実験2-1

上記実験1-1で合成したペンタデカアデニル酸誘導体 [(9)] 約1.0 OD を0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH8.3) 10 μ lに溶解し、ビオチンスクシンイミドエステルのジメチルホルムアミド溶液10 μ l (数百倍過剰に相当) を加えて4℃で一夜または室温で4時間反応させて、ビオチン-ペンタデカアデニル酸 [(4)] を合成する。

反応の確認は、高速液体クロマトグラフィーおよび20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行なった。またその際、反応性の比較のため上記で合成したオリゴスクレオチド [(7)] を脱保護して得た5'-水酸基をもつ化合物 [(12)] も同様にビオチンスクシンイミドエステルと反応させる。

上記実験1-2、1-3および1-4で合成した化合物 [(10)] についても実験2-1と同様な操作を行なつて各々について化合物 [(4)] を製造する。また、反応の比較のため5'-水酸基をもつ化合物 [(12)] をも製造し、化合物 [(12)] とビオチン活性エステルとを各々反応させる。このときの実験を各々実験2-2、2-3および2-4とした。

実験2で製造した化合物を第2表に示す。



第2表

誘導体 実験例	化合物 (12) の内容		化合物 (4) の内容	
	n	(B) _n B	m+n	(B) _{m+n} B
2-1	12	AAAAAAAAAAAA	14	AAAAAAAAAAAAAAA
2-2	12	TTTTTTTTTTTT	14	TTTTTTTTTTTTTTT
2-3	12	ATGCATCACCACC	14	GGATGCATCACCACC
2-4	14	TCTGGTGAGAACGCGC	16	AATCTGGTGAGAACGCGC

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

以上の結果を第4および5図 (高速液体クロマトグラフィーの結果) および第6および7図 (電気泳動の結果) に示す。

第4図は高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示すものである。図中1は何れも反応前の化合物そのものの、2は何れもビオチンと化合物を混合したものの、3は何れも化合物とビオチン活性エステルとを反応させたもののクロマトグラムである。1は実験2-1で式 [(12)] の化合物、ロは実験1-1で式 [(9)] である化合物、ハは実験2-2で式 [(13)] である化合物、ニは実験1-2で式 [(10)] である化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なおピーク上の数値は保持時間を示す。

第5図は高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示すものである。図中の1は何れも反応前の化合物そのものの、2は何れもビオチンと化合物を混合したものの、3は何れも化合物とビオ

チン活性エステルとを反応させたもののクロマトグラムである。ホは実験2-3で式〔12〕の化合物、へは実験1-3で式〔10〕である化合物、トは実験2-4で式〔12〕の化合物の、チは実験1-4で式〔10〕の化合物について上記のような操作を行なった際のクロマトグラムを示す。なお、ピーク上の数値は保持時間を示す。

第6図は電気泳動の結果を示すものである。(a)、(c)、(e)および(g)は、各々実験2-2の〔12〕、1-2の〔10〕、2-1の〔12〕および1-1の〔10〕の化合物の結果を示す。また、(b)、(d)、(f)および(h)は各々実験2-2の〔12〕、1-2の〔10〕、2-1の〔12〕および1-1の〔10〕の各々の化合物とピオチン活性エステルとを反応させた後の結果を示す。XCはキシレンシアノールの、BPBはプロモフェノールブルーのバンドをそれぞれ示し、ともに電気泳動の標識として用いるものである。なお図中で上がマイナス側、下がプラス側を示す。

第7図は電気泳動の結果を示すものである。(j)、(l)、(n)および(p)は各々実験1-4の〔10〕、2-4

の〔12〕、1-3の〔10〕および2-3の〔12〕の化合物の結果を示す。また、(i)、(k)、(m)および(o)は各々実験1-4の〔10〕、2-4の〔12〕、1-3の〔10〕および2-3の〔12〕の各々の化合物とピオチン活性エステルとを反応させた後の結果を示す。BPBは上記と同じ意味、また図中で上がマイナス側、下がプラス側を示す。

高速液体クロマトグラフィーによる結果(第4図および5図)からみれば、式〔12〕で示される5'-水酸基をもつ化合物(第4図イ-1、第4図ハ-1、第5図ホ-1および第5図ト-1)はピオチンと反応せず(第4図イ-3、第4図ハ-3、第5図ホ-3、および第5図ト-3)、終始単一ピークのみである。それに対してオリゴヌクレオチド誘導体〔式(10)〕はピオチンと反応させると、高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンに変化が生じて、原料のピーク(第4図ロー-1、第4図ニ-1、第5図ヘ-1および第5図テ-1)はなくなっており、ピオチン活性エステルと反応して新しい化合物(第4図ロー-3、第4図ニ-3、第5

図ヘ-3および第5図テ-3)ができていことがわかる。なお、第4~5図ロ、ニ、ヘおよびテの2はピオチン活性エステルと化合物〔10〕とを混合し、第4~5図イ、ハ、ホおよびトの2はピオチン活性エステルと5'-水酸基をもつ化合物〔12〕とを混合して実際に行なつた反応の前後の溶出パターンと対比させたものであるが、これらを見比べてみても一級アミノ基を有する化合物〔10〕はピオチン活性エステルと選択的に反応し、5'-水酸基をもつ化合物〔12〕とは反応していないことがわかる。

一方第6図および第7図の電気泳動の結果から、5'-水酸基化合物とピオチン活性エステルとの反応を見ると(a)・(b)、(c)・(d)、(k)・(l)および(o)・(p)参照)、反応前(a)、(c)、(k)および(p)のバンドの位置と反応後(b)、(d)、(l)および(o)のバンドの位置に相違が見られないことより、ピオチンとの反応は生じていないことがわかる。また、一級アミノ基を有するオリゴヌクレオチド(c)・(d)、(g)・(h)、(i)・(j)および(m)・(n)参照)とピオチン活

性エステルとの反応を見ると、反応前(c)、(g)、(i)および(n)のバンドの位置と反応後(d)、(h)、(j)および(m)のバンドの位置とが異なっており、ピオチンと反応していることがわかる。

以上の結果より、上記で合成した一級アミノ基を有する化合物は、ピオチン活性エステルと選択的に反応していることがわかる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

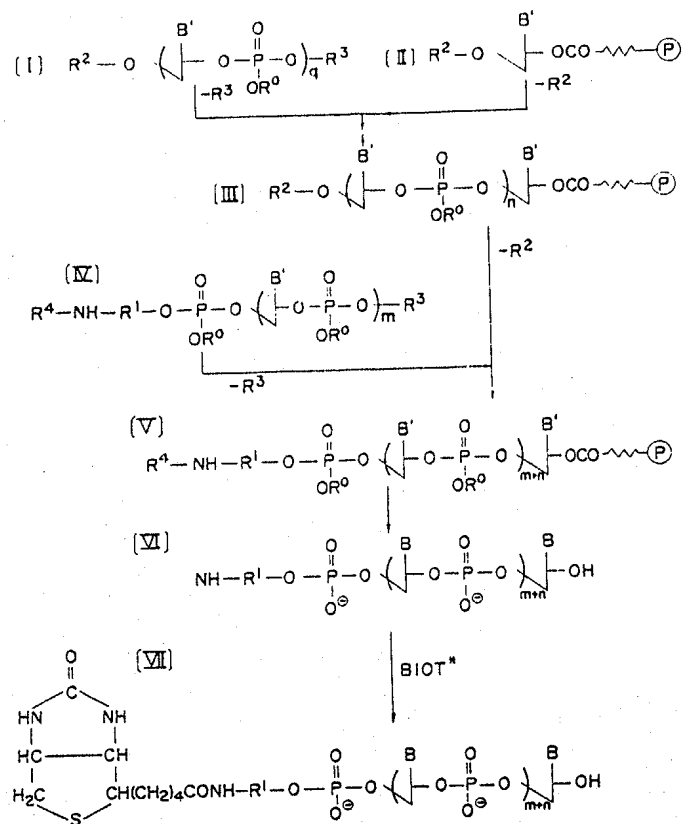
第2図は、実験例で示した本発明化合物の製造法のフローチャートである。

第3図A~Dは、実験例で示した化合物〔VI〕の高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図である。

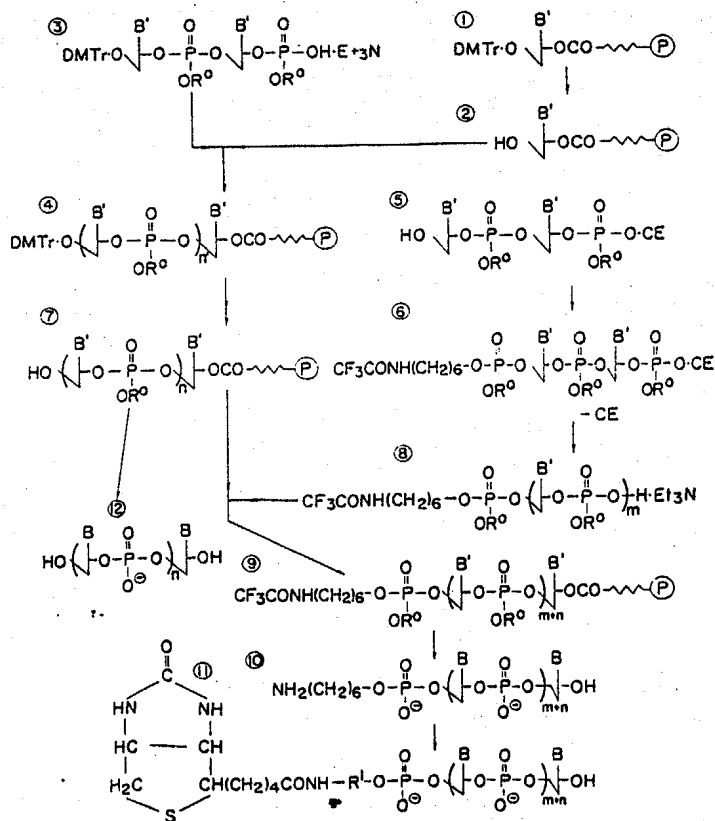
第4~5図は、いずれも高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示す図である。

第6~7図は、いずれも電気泳動の結果を示す図である。

第 1 図

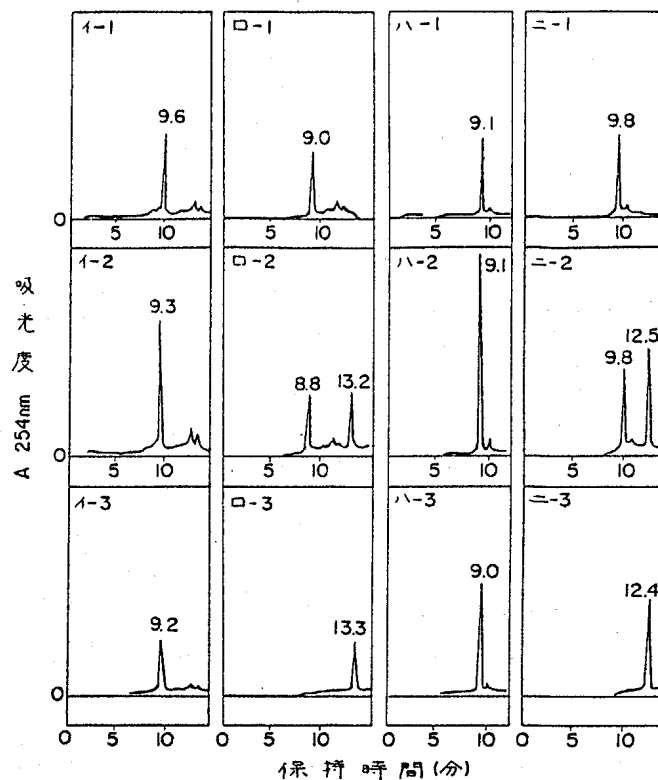
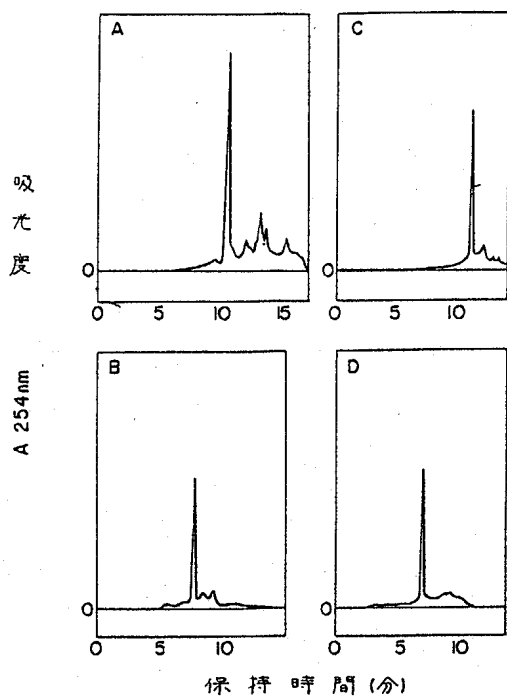


第 2 図

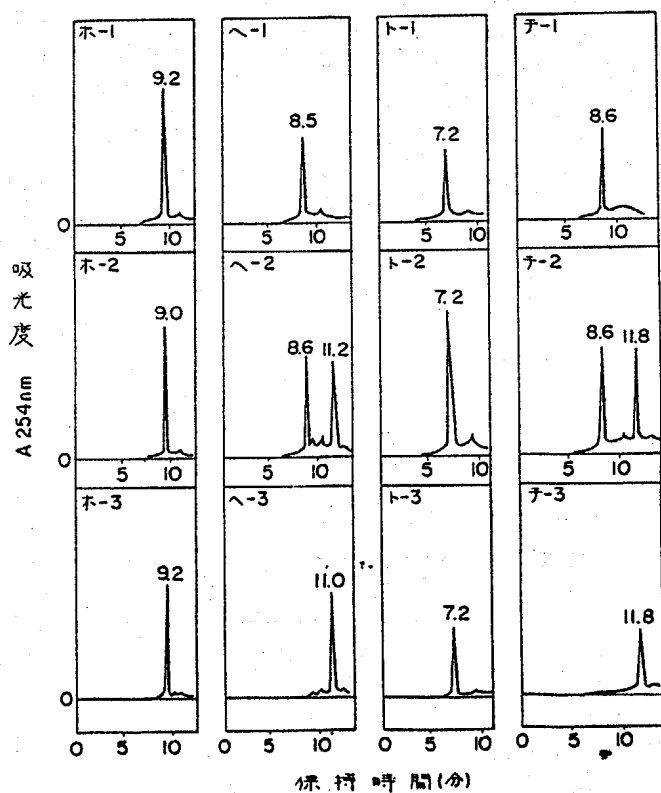


第 4 図

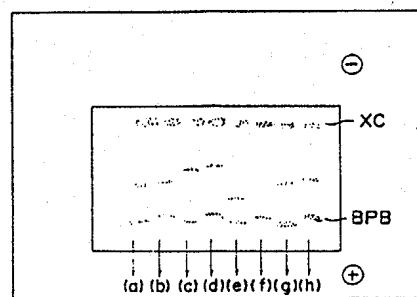
第 3 図



第 5 図



第 6 図



第 7 図

